GUIDE POUR L'ACCOMPAGNEMENT DE LA VERIFICATION DE LA METHODE (Portée de type A) DE l'AUTOMATE iQ®200

Beckman Coulter – Urinalysis

SOMMAIRE :

1. Objet et domaine d'application 3

2. Objectifs 3

3. Terminologies et abréviations 4

4. Documents de référence 4

5. La vérification de la méthode (Portée de type A) 5

5.1 Vérifications préalables 5

5.2 Présentation de la technique 5

5.2.1. But de la vérification 5

5.2.2. Domaine d'application 5

5.3 Détermination des critères des performances pour l'appareil 6

5.4 Détermination des limites d'acceptabilité 7

5.5 Vérification bibliographique 7

5.6 Les essais 7

5.6.1. Répétabilité : Sur les globules rouges et blancs d'échantillons patients 7

5.6.2. Fidélité intermédiaire (interne au laboratoire) 8

5.6.3. Utilisation du "Precision kit" IRIS 8

5.6.4. Limite de détection 9

5.6.5. Linéarité des globules rouges et globules blancs pour des échantillons patients 10

5.6.6. Contamination inter-échantillons ou "Carry over" pour les G.R ou les G.B 11

5.6.7. Corrélation avec la méthode déjà utilisée au laboratoire 12

5.7 Traitement statistique des essais et les résultats 12

5.8 Conclusion et décision 12

1. Objet et domaine d'application :

Ce document constitue un guide lors de l'installation de l'automate iQ200, modèle Select, Elite et Sprint et se réfère au COFRAC SH SHGTA 04 et à la norme ISO 15189. Il ne peut en aucun cas se substituer aux textes réglementaires et normatifs aux quels il se rapporte. Il détaille les différentes actions à mettre en œuvre afin de constituer le dossier de vérification de la méthode nécessaire, lors de l'intégration de notre appareil au sein de votre laboratoire. Le SH GTA 04 étant un texte non exhaustif et non opposable, le laboratoire peut se réserver le droit d'ajouter des essais complémentaires qu'il jugera judicieux pour son dossier en plus de ceux proposés dans le présent document.

2. Objectif :

Adopter la méthode du fournisseur IRIS pour l'iQ 200, en réalisant la vérification des données de performance de ce dernier, selon les recommandations du SH SHGTA 04 pour méthode quantitative (Portée de type A).

3. Terminologies et abréviations :

Fidélité :

Elle qualifie l'étroitesse de l'accord entre les valeurs mesurées obtenues par des mesures répétées du même échantillon dans des conditions spécifiées. Elle est généralement exprimée numériquement en termes d'infidélité par l'écart-type, la variance ou le coefficient de variation. La fidélité dépend uniquement de la distribution des erreurs aléatoires (aucune relation avec la valeur vraie). Les conditions spécifiées peuvent être des conditions de répétabilité, des conditions de fidélité intermédiaire ou des conditions de fidélité intermédiaire.

Répétabilité :

Elle sera établie dans des conditions où les résultats sont obtenus par la même méthode avec des échantillons identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, avec le même équipement, la même méthodologie, le même lot de réactif et de calibrant et pendant un intervalle de temps restreint.

Fidélité intermédiaire :

Elle sera établie dans des conditions où les résultats sont obtenus par la même méthode avec des échantillons identiques dans différents laboratoires et/ou un opérateur différents et/ou un équipement différent et/ou un lot de réactif et de calibrant différents pendant un intervalle de temps assez important. On définit en fonction des conditions spécifiées : une fidélité intermédiaire intra-laboratoire et une fidélité intermédiaire inter-laboratoires.

Erreur aléatoire :

Elle représente la composante de l'erreur de mesure qui, lors de mesures répétées, varie de façon imprévisible. Dans ce cas, la valeur de référence pour une erreur aléatoire est la moyenne qui résulterait d'un nombre infini de mesures répétées du même mesurande (grandeur mesurée). Les erreurs aléatoires d'un ensemble de mesure peuvent être décrites par la variance.

Justesse :

Elle qualifie l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre élevé de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence. La valeur de référence peut être une valeur vraie de la grandeur mesurée ou une valeur assignée d'un matériau de référence dont l'incertitude de mesure est négligeable. La justesse s'exprime qualitativement. Elle varie en sens inverse de l'erreur systématique. La justesse est quantifiée par le biais qui représente la différence entre l'espérance mathématique des résultats et la valeur de référence. Le biais est une erreur systématique totale. Il peut y avoir plusieurs erreurs systématiques qui contribuent au biais.

Erreur systématique :

L'erreur systématique est définie comme la composante de l'erreur de mesure qui lors de mesurages répétés, demeure constante ou varie de façon prévisible.

4. Documents de référence :

- Document Cofrac SH SHGTA 04, SH FORM 43 (méthode quantitative) et SH FORM 44 (méthode qualitative),
- Normes ISO 15189,
- GBEA II – Chap. 1.1c ; 2.6 ; 2.11 ; 2.13 ; 2.14 ; 2.15 ;
- Directive 98-79-CE,
- QUAMIC 2013.

5. LA VERIFICATION DE LA METHODE

5.1 Vérifications préalables

Les analyseurs série iQ 200 disposent du marquage CE, le document est disponible dans le manuel utilisateur et le numéro du marquage est accessible à l'arrière de l'appareil. Les consommables comme le liquide de gainage "Lamina", les contrôles internes de qualité, le calibrant, les solutions de lavage et de rinçage (resp. "Cleanser" et "Diluent") sont marqués CE. Les fiches techniques et les fiches de sécurité des consommables sont accessibles sur demande au siège de la société Beckman Coulter France. Le certificat ISO 13189 d'IRIS INTERNATIONAL est disponible sur demande au service qualité de Beckman Coulter France.

5.2 Présentation de la technique, de l'appareillage et du mode opératoire

Le principe de la méthode, de l'appareillage, et du mode opératoire sont détaillés dans le manuel de l'opérateur au format PDF accessible sur l'iQ 200. Une description simplifiée est accessible au chapitre 1 du dossier de vérification de la méthode.

5.2.1 But de la vérification

L'objectif est de vérifier les performances de l'automate iQ 200 spécifiées par la société Beckman Coulter. Nous démontrerons que la méthode fonctionne correctement dans les conditions opératoires du laboratoire et que les résultats sont sûrs pour les patients.

5.2.2 Domaine d'application

L'iQ 200 réalise les analyses de cytologie urinaire à partir d'échantillons d'urine. L'iQ 200 dénombre les différents éléments contenus dans les urines aussi bien les cellules que les sédiments : globules rouges, globules blancs, amas de globule blancs, bactéries, mucus, spermatozoïdes, cylindres hyalins, cylindres pathologiques, petites cellules rondes, cellules épithéliales, cristaux et levures.

5.3 Détermination des critères des performances pour l'appareil

Les performances à vérifier, sont celles décrites dans le SH SHGTA 04 - chap. 9.1.1 page 11 pour une technique quantitative (portée de type A).

Paramètres à vérifier	Bibliographie	Portée de type A
Spécificité analytique	Oui	**Non**
Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Oui	**Oui**
Justesse (approche)	Oui	**Oui (dès que possible)**
Intervalle de mesure (limite de quantification et limites de linéarité)	Oui	**Si besoin**
Incertitudes/ facteurs de variabilité et évaluation	Oui	**Oui**
Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)	Oui	**Oui, pour les paramètres sensibles**
Stabilité des réactifs (après ouverture/embarqué)	Oui	**Non**
Robustesse	Non	**Non**
Interférences	Oui	**A vérifier si nécessaire**
Intervalles de référence	Oui	**A vérifié dès que possible, si justifié**
Comparaison d'une méthode déjà utilisée au laboratoire	Oui (si existe)	**Oui (si possible)**
Analyse des discordances	Oui	**Oui**

Tableau des paramètres à vérifier au laboratoire – extrait du SH SHGTA 04 – Chap. 9.1.1

5.4. Détermination des limites d'acceptabilité

Les limites d'acceptabilité de la méthode sont résumées dans le tableau en annexe 4 du compte rendu de la vérification de la méthode.

5.5 Vérification bibliographique

Les références bibliographiques sont présentées dans le compte rendu de la vérification de la méthode.

5.6 Les essais

Avant de débuter les essais, vérifier la calibration qui doit dater de moins de 15 jours. Calibrer l'appareil si nécessaire. L'appareil doit être contrôlé de la même manière qu'une analyse de routine. Réaliser les opérations de maintenance et de contrôle qualité du matin sur l'iQ 200 IRIS : cleanser / diluent / diluent / focus / contrôle positif / contrôle négatif.

5.6.1. Répétabilité : Sur les globules rouges et globules blancs d'échantillons patients

L'essai de répétabilité consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon, dans des conditions standardisées et identiques : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même calibrateur. Extrait du SH GTA04 page 16 : "En pratique il est recommandé d'utiliser 2 niveaux de concentration….ils sont choisis en fonction des valeurs physiopathologiques, ….l'effectif idéal est de 30….. un nombre d'essais inférieur devra être argumenté en fonction de critères pertinents".

Matériel

Les tubes utilisés sont en PP ou PS, transparents, à fond rond de 10 ml.
Sélectionner des échantillons patients à l'état frais - moins de 4 heures à réception au laboratoire - ne pas mettre les urines au réfrigérateur afin de prévenir la formation de cristaux, et en évitant la présence de mucus, spermatozoïdes, levures et de cristaux amorphes.

Méthode

Agiter le pot primaire par retournements entre chaque préparation de tube et remplir les tubes avec 2,5 ml d'urine. Chaque rack doit être préparé extemporanément.

*Sélectionner un échantillon avec une valeur en globules rouges d'environ 10 à 15 p/µl (niveau 1).
Sélectionner un échantillon avec une valeur en globules rouges d'environ 200 à 500 p/µl (niveau 2).
*Sélectionner un échantillon avec une valeur en globules blancs d'environ 10 à 15 p/µl (niveau 1).
Sélectionner un échantillon avec une valeur en globules blancs d'environ 200 à 500 p/µl (niveau 2).

Préparer les tubes sur un rack patient et lancer immédiatement l'analyse.

Remarque : prélever plusieurs fois dans un même tube fausse la concentration en éléments. Si vous n'avez pas assez d'urine pour confectionner les tubes, vous pouvez réaliser deux passages au minimum sur un rack de 10 tubes de 2,1 ml. (référence QUAMIC 2013 page 49: "La répétabilité doit être évaluée sur les hématies et les leucocytes dans des conditions standardisées (même opérateur, même lot de réactifs), en passant consécutivement si possible 20 fois un échantillon dans une même série.")

Traitement des Résultats

Les tubes ne présentant pas de code à barres, ils seront arrêtés automatiquement à l'écran. Cliquer sur 'Revoir Echantillon marqué' puis nommer les échantillons de la manière suivante : Repet-GR-N1-1, Repet-GR-N1-2 …etc. Avec N1-1 pour niveau 1 échantillon 1, N1-2 : niveau 1 échantillon 2…etc. Imprimer un rapport consolidé de la série.

Les résultats sont enregistrés sur la fiche Excel. Le calculateur donne ensuite la moyenne, l'écart type et le coefficient de variation pour chaque niveau. La valeur du CV est comparée au CV limite admissible de Beckamn Coulter – Gamme Iris. Cf . Tableau A du Chapitre 4.

5.6.2. Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pour la même analyse dans des conditions différentes : l'opérateur, la date, etc… sont considérés comme des données variables.

Matériel

Les tubes utilisés sont en PP ou PS, transparents, à fond rond de 10 ml.
Le flacon "Positive Control" issu du coffret du contrôle interne de qualité de l'appareil.

Méthode

Cet essai est réalisé sur 30 jours avec le même coffret de contrôle interne de qualité et avec le niveau haut.

Résultats

Editer les résultats par l'interface de l'iQ 200, Sélectionner l'onglet "Instrument" et cliquer "Stats C.Q.", sélectionner le CIQ positif à étudier et imprimer les résultats sur un lot complet ou une période donnée du lot.
La fiche présente la moyenne, l'écart type et le coefficient de variation. La valeur du CV est comparée au CV limite admissible de Beckman Coulter – Gamme IRIS. Elle doit être inférieure à 10 %.

5.6.3. Utilisation du "Precision kit" IRIS

IRIS a développé un kit : "Precision kit", destiné exclusivement à la réalisation de cet essai. Le coffret comprend les 3 niveaux en hématies stabilisées humaines. Le "precision kit" permet sur une série de 50 échantillons de déterminer la linéarité, la répétabilité, la contamination inter-échantillon du "banc optique" de l'iQ 200 et une estimation du biais.

Matériel

Le kit comprend :

- un niveau bas, "Negative control", environ 0 particules /µl *
- un niveau moyen, "Middle control", environ 500 particules / µl *
- un niveau haut, "Positive control", environ 1000 particules /µl *

* selon le lot du coffret – la valeur est mentionnée sur le flacon

Les tubes utilisés sont en PP, transparents, à fond rond de 10 ml. Ce kit permet de réaliser des essais sur 50 échantillons (5 rack de 10 tubes).

Méthode :

Le protocole utilisé est décrit dans le document Protocole pour le "Precision kit" d'IRIS.
La justesse, quantifiée par le biais, est estimée en comparant la moyenne obtenue (m) lors de l'étude de répétabilité à la valeur cible attendue, assimilée à la valeur (v) de l'échantillon testé. On réalisera le calcul pour le niveau haut ('positive control').

La justesse est exprimée en pourcentage de la valeur cible, selon le calcul suivant :

Biais en % = [(m-v)/v] x 100

Résultats :

Les résultats sont calculés dans la fiche Excel correspondante.

5.6.4. Limite de détection

Il s'agit du plus petit signal exprimé en quantité ou en concentration qui peut être distingué, avec une probabilité donnée, d'un blanc de réaction réalisé dans les meilleures conditions. Elle représente la quantité minimale détectable pour laquelle la réponse peut être distinguée, avec une probabilité donnée, d'un blanc de réaction.

L'étude de la limite de détection est basée sur l'analyse statistique de la différence de signaux observés pour les blancs et les échantillons.

Matériel

Les tubes utilisés ensuite sur l'iQ sont en PP ou PS, transparents, à fond rond de 10 ml. Utiliser l' IRIS Diluent ou de l'eau physiologique pour préparer les 30 tubes avec un volume de 2,5 ml.

Méthode

Nettoyer l'appareil avec un rack de maintenance du matin contenant seulement les 3 premier tubes : Cleanser / Diluent / Diluent.

Lancer les 30 tubes dans une même série.

Traitement des Résultats

Les tubes ne présentant pas de code à barres, ils seront arrêtés automatiquement à l'écran. Cliquer sur 'Revoir Echantillon marqué' puis nommer les échantillons de la manière suivante : Limit Detect-1, Limit Detect-2…etc.. Imprimer un rapport consolidé de la série.

Les résultats sont enregistrés sur la fiche Excel correspondante. Le calculateur donne ensuite la limite de détection de votre iQ200.

5.6.5. Contamination inter-échantillons ou "Carry over" pour les G.R ou les G.B

Une étude de contamination est effectuée sur le banc optique lors des essais du "precision kit" IRIS. Le laboratoire peut rajouter cependant une étude supplémentaire.

Matériel

Les tubes utilisés sur l'iQ sont en PP ou PS, transparents, à fond rond de 10 ml.
Sélectionner des échantillons patients à l'état frais - moins de 4 heures à réception au laboratoire - ne pas mettre les urines au réfrigérateur afin de prévenir la formation de cristaux, et en évitant la présence de mucus, spermatozoïdes, levures et de cristaux amorphes.

Méthode

Nous ne sélectionnerons pas d'échantillons hétérogènes qui pourraient boucher l'appareil. Pour rappel : les urines hétérogènes doivent être diluées selon la procédure IRIS afin de préserver l'appareil.

Sélectionner un échantillon "haut" (noté H) avec une valeur en globules blancs ou rouges d'environ 1000 à 5 000 p/µL. Sélectionner un échantillon "bas" (noté B) avec une valeur en globules blancs ou rouges d'environ 30 à 50 p/µL (alternatif : prenez de l'eau physiologique).

Réaliser la préparation du rack avec 3 tubes de l'échantillon "haut", identifié H1, H2 et H3. Puis les 3 tubes de l'échantillon "bas" identifiés B1, B2 et B3.

H1	H2	H3	B1	B2	B3

Les séquences sont répétées plusieurs fois (5 fois) (Cf. SH GTA04 – page 19). Remarque importante : préparer pour chaque passage un nouveau rack. Le rack préparé est analysé dans la foulée sur l'iQ. L'homogénéisation des échantillons doit être réalisée avec la plus grande des attentions.

La formule pour le calcul est : contamination en % = [(moyenne B1- moyenne B3) / (moyenne H- moyenne B3)] x 100.

Avec moyenne H = moyenne (H1-1, H2-1, H3-1, H2-1, …..Hi-j) avec i = 1 à 5 et j = 1 à 3.

Les résultats sont saisis sur la fiche Excel correspondante.

5.6.6. Comparaison avec la méthode déjà utilisée au laboratoire

SHGTA 04 – Chap 11.9 – page 21

« Cette étude de la comparaison ne peut intervenir qu'après la vérification des critères suivants : répétabilité, fidélité intermédiaire (…), justesse, limite de détection ou de quantification, limite de linéarité… »

Matériel

Les tubes utilisés ensuite sur l'iQ sont en PP ou PS, transparents, à fond rond de 10 ml. Sélectionner des échantillons patients à l'état frais (moins de 4 heures à réception au laboratoire), ne pas mettre les urines au réfrigérateur (pour éviter la formation de cristaux). Utiliser les codes à barres du laboratoire pour identifier les tubes.

Méthode

SHGTA 04 – Chap 11.9 – page 21

« Pour comparer les résultats d'une méthode Y avec ceux d'une méthode X (utilisée au laboratoire ou prise comme référence), on analyse au moins 30 échantillons de patients couvrant de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique (…).
Ces échantillons, frais de préférence, sont analysés en simple par les 2 techniques, dans un délai le plus court possible »

La lecture en manuel et le passage sur l'iQ des échantillons doivent se faire en une heure au maximum afin d'éviter les variabilités dues aux dégradations des matrices.

L'agitation des échantillons doit être réalisée avec la plus grande des attentions à chaque échantillonnage.

iQ200 vs technique manuelle:

Les urines sont montées en manuel en cellule par un technicien selon le protocole du fournisseur des cellules. Le prélèvement se fera avec une pipette et non pas à l'oese. Respecter les temps d'attente avant la lecture des échantillons.

Préparer en parallèles les tubes avec code à barres et les passer sans attendre sur l'iQ 200. Le technicien validera la série à l'écran de l'iQ.

Le technicien confronte les deux résultats : iQ200 et manuel.
En cas de discordance, un deuxième technicien remonte une lame **à partir d'un 2ème pipetage et après homogénéisation du flacon/tube d'urine primaire.**
Si la discordance persiste entre manuel et iQ200, préparer un autre aliquote sur tube **après homogénéisation du pot/tube d'urine primaire** afin de le passer sur l'iQ200.
Confronter les deux validations de l'iQ.

Un consensus doit être trouvé par le biologiste.

Les résultats sont saisis dans la fiche de calcul EXCEL 'iQ200_Correlation Report_iQ200 et méthode manuelle'. Le tableur permet le calcul de la sensibilité, spécificité, faux positif, faux négatif et taux de concordance entre les deux techniques.

iQ200 vs Système automatisé du laboratoire:

En cas de comparaison avec un système automatisé déjà en place au laboratoire, préparer deux tubes différents et les passer en parallèle au même moment sur l'iQ 200 et sur le système automatisé en place. Le technicien validera la série sur les deux automates en respectant les règles de validation du fournisseur.

Le technicien confronte les deux résultats : iQ200 et autre système automatisé.
En cas de discordance, préparer deux autres aliquotes différents sur tube **après homogénéisation du pot/tube d'urine primaire** afin de le passer sur l'iQ200 et sur le système automatisé du laboratoire.
Confronter les deux résultats obtenus sur chacun des systèmes.

Un consensus doit être trouvé par le biologiste.

Les résultats sont saisis dans la fiche de calcul EXCEL 'iQ200_Correlation Report. Le tableur permet le calcul de la sensibilité, spécificité, faux positif, faux négatif et taux de concordance entre les deux techniques.

5.7 Traitement statistique des essais et les résultats

Un classeur est constitué pour présenter les résultats.

5.8 Conclusion et décision

Le biologiste conclu sur la validation de la méthode après analyse des résultats.